



L1 ANSWER 1 OF 1 WPINDEX COPYRIGHT 2006 THE THOMSON CORP on STN  
AN 1998-1031770 [EX] WPINDEX Full-text  
DNN N1998-1031770 DNC C1998-043590  
TI Reagent for tumour diagnosis - comprising multiple oligo nucleotide(s) or  
polynucleotide(s) complementary to tumour marker genes.  
DC B04 D16 S03  
IN BENDZKO, P; HILLEBRAND, T; STRAUSS, M  
PA (INVI-N) INVITEK GMBH  
CYC 1  
PI DE 19736715 A1 19980219 (199813)\* 3 C07H021-00 <--  
ADT DE 19736715 A1 DE 1997-1036715 19970818  
PRAI DE 1996-19633228 19960817  
IC ICM C07H021-00  
ICS C12Q001-68; G01N033-50; G01N033-543; G01N033-574  
AB DE 19736715 A UPAB: 19980330  
Reagent for complex molecular tumour diagnosis comprises at least 2 different  
oligonucleotides or polynucleotides with defined complementarity to tumour  
marker genes.  
USE - The reagent is used in a method comprising: (a) incubating the reagent  
with nucleic acids (DNA, RNA or viral nucleic acids) from tumour material,  
where the reagent is immobilised on a solid phase and the nucleic acids are  
labelled, or vice versa, and (b) detecting and quantifying the labelled  
hybridisation product bound to the solid phase (all claimed). Dwg.0/0  
FS CPI EPI  
FA AB  
MC CPI: B04-B03C; B04-C03B; B05-A03B; B06-F03; B11-C08E4; B12-K04A1; D05-H09;  
D05-H12A; D05-H13  
EPI: S03-E14H; S03-E14H4

This Page Blank (uspto)



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 197 36 715 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 07 H 21/00**  
G 01 N 33/50  
G 01 N 33/543  
G 01 N 33/574  
C 12 Q 1/68

②1 Aktenzeichen: 197 36 715.1  
②2 Anmeldetag: 18. 8. 97  
④3 Offenlegungstag: 19. 2. 98

**DE 197 36 715 A 1**

⑥6 Innere Priorität:  
196 33 228.1 17.08.96

⑦1 Anmelder:  
InViTek GmbH, 13125 Berlin, DE

⑦2 Erfinder:  
Hillebrand, Timo, Dr., 12619 Berlin, DE; Bendzko,  
Peter, Dr., 12623 Berlin, DE; Strauss, Michael, Prof.  
Dr., 13187 Berlin, DE

⑤4 Mittel und seine Verwendung zur komplexen molekularen Tumordiagnostik

⑤7 Die Erfindung betrifft ein Mittel und seine Verwendung zur komplexen molekularen Tumordiagnostik. Unter komplexer Tumordiagnostik werden die Früherkennung, die Charakterisierung des Entwicklungsstadiums, die Prognose und die Therapieverlaufskontrolle verstanden.

**DE 197 36 715 A 1**

Die Erfindung betrifft ein Mittel und seine Verwendung zur komplexen molekularen Tumordiagnostik. Unter komplexer Tumordiagnostik werden die Früherkennung, die Charakterisierung des Entwicklungsstadiums, die Prognose und die Therapieverlaufskontrolle verstanden.

Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Die sichere Diagnose von Tumoren in den verschiedenen Wachstumsstadien ist ein Ziel, mit dem sich weltweit eine große Zahl von Wissenschaftlern beschäftigt. Im Mittelpunkt solcher Arbeiten steht der Tumornachweis mit Hilfe von Tumormarkern. Bekannte Tumormarker, die auch schon diagnostisch genutzt werden, sind p53 (Clinical applications of the p53 tumor suppressor gene, Clin-Chim-Acta. 1995 Jun 15; 327 (1-2): 79-90) und p16 (Alterations of the p16 (MTS1) gene in testicular, ovarian, and endometrial malignancies, J-Urol. 1995 Nov; 154 (5): 1954-7).

Diagnosen auf der Basis von einzelnen Tumormarkern haben nur einen begrenzten Prognosewert, weil sie nur für einen speziellen Tumor (bzw. mehrere Tumoren) spezifisch sind und dadurch die gesamte Komplexität einer Tumorerkrankung nicht erfassen. Die Genauigkeit der Diagnose liegt daher nur bei ca. 60%.

Die Erfindung hat das Ziel, die molekulare Tumordiagnostik so zu vereinfachen, daß eine routinemäßige Anwendung in der Labordiagnostik möglich wird. Ihre Aufgabe besteht darin, ein Mittel und ein Verfahren zu entwickeln, welches die Aussagesicherheit hinsichtlich Prognose und Therapiemöglichkeiten erhöht.

Die Aufgabe der Erfindung wird durch ein Mittel gemäß Anspruch 1 und den Unteransprüchen 2-20 sowie durch seine Verwendung gemäß Anspruch 21 und den Unteransprüchen 22-36 gelöst.

Das erfindungsgemäße Mittel zur komplexen molekularen Tumordiagnostik ist dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens 2 verschiedene Oligonukleotide oder Polynukleotide mit definierter Komplementarität zu einem Tumormarkergen oder zu mehreren Tumormarkergenen enthält.

Vorzugsweise enthält es 2, 3 oder 4 bis 12 Oligonukleotide oder Polynukleotide, wobei die Oligonukleotide oder Polynukleotide komplementär zu Tumorsuppressoren sind, vorzugsweise komplementär zu Onkogenen. Insbesondere komplementär zu den Tumormarkergenen p53, Rb, p16, cyclinD1, cdk4, Ki-ras, APC, DCC, DPC4 bcl-2, bax, PSA, HpV, mdrl oder zu membran-gebundenen humanen Metallomatrixproteasen wie z. B. MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP oder MT4-MMP.

In einer bevorzugten Ausführungsvariante sind mindestens 2 verschiedene Oligonukleotide oder Polynukleotide mit definierter Komplementarität zu einem, bevorzugt mehreren, Tumormarkergenen an eine feste Phase gebunden.

Als feste Phase im Sinne der Erfindung kommt in Frage die Oberfläche eines Lichtwellenleiters oder eines Evaneszentfeld-Transducers (einschließlich Oberflächenplasmonenresonanz, SPR), die Oberfläche eines Schwingquarzes eines elektroakustischen Oberflächenschwingers (SAW), die Oberfläche einer Elektrode oder einer Interdigitalelektrode. Sie besteht bevorzugt aus Glas, Quarzglas, Silizium oder Siliziumoxid oder Gemischen davon, Tantalexid, Gold, Platin oder einem anderen Edelmetall sowie Legierungen davon oder aus ei-

nem Kunststoff wie Polystyrol oder Polycarbonat.

Besonders bevorzugt weist die feste Phase die Form eines Mikrochips auf.

Dabei sind die Oligonukleotide oder Polynukleotide vorzugsweise auf der festen Phase systematisch, z. B. in Streifen oder Rechtecken, angeordnet, um eine eindeutige Zuordnung zu gewährleisten oder sie sind auf der festen Phase kovalent gebunden, z. B. durch Knüpfen einer 5'-Phosphordiesterbindung, oder durch direkte Synthese auf einem Chip.

In einer weiteren Ausführungsvariante können sie auf der festen Phase über irreversible Brückenfunktionen wie Biotin-Avidin gekoppelt sein, wobei Avidin bzw. Streptavidin kovalent über Vernetzung an die Oberfläche gekoppelt ist oder auch über Brückenfunktionen reversibel gebunden ist, wie z. B. durch Disulfidbindungen.

Die erfindungsgemäßen Mittel werden zur komplexen Tumordiagnostik verwendet, indem sie mit Nukleinsäuren (DNS, RNS oder virale Nukleinsäuren) aus Tumormaterial inkubiert werden, wobei entweder das Mittel oder die Nukleinsäure an eine feste Phase gebunden und der jeweils andere Partner markiert ist, und das an die Festphase gebundene Hybridisierungsprodukt über die Markierung detektiert und quantifiziert wird.

Gemäß der Erfindung ist das Mittel an der Festphase gebunden und wird mit markierten Nukleinsäuren aus Tumormaterial inkubiert.

Bevorzugt werden die Nukleinsäuren aus Tumormaterial an der Festphase gebunden und mit dem markierten Mittel inkubiert.

In einer Ausführungsvariante werden die Nukleinsäuren aus Tumormaterial durch Lyse dieser Zellen mit Lösungen, die chaotrope Salze enthalten, oder mittels Proteinase K, Bindung der Nukleinsäuren an mineralische Trägermaterialien, vorzugsweise nichtporöse SiO<sub>2</sub>-Partikel mit einer Größe von kleiner 50 nm und Elution der gebundenen Nukleinsäuren mit Puffern, die geringe Ionenstärken enthalten, isoliert.

Die Nukleinsäuren (DNS, RNS oder virale Nukleinsäuren) werden insbesondere aus nichtinvasiven verfügbaren Ausgangsmaterialien gewonnen.

Der Nachweis von Veränderungen der Tumormarkergene erfolgt erfindungsgemäß über basenkomplementäre Hybridisierungsreaktionen an fester Phase, wobei sich entweder ein Sequenzabschnitt des Tumormarkergens oder das Oligonukleotid oder Polynukleotid an fester Phase befinden und mit dem jeweiligen basenkomplementären Oligonukleotid, Polynukleotid bzw. dem Sequenzabschnitt des Tumormarkergens inkubiert wird.

Außerdem kann der Nachweis der Hybridisierungsreaktion auch direkt über laserinduzierte Anregung einer oder mehrerer Fluoreszenzsonden erfolgen.

Eine Detektion kann deshalb im evaneszenten Feld eines Lichtwellenleiters oder eines strukturierten Lichtwellenleiters oder durch Oberflächenplasmonenresonanz oder mittels eines elektroakustischen Transducers (Schwingquarz oder SAW) stattfinden.

In weiteren Varianten erfolgt die Detektion mittels einer Elektrode oder Interdigitalelektrode, vorzugsweise unterstützt durch elektroaktive DNA-Binder oder sie wird durch Fluorochrome vermittelt, die entweder zugegeben oder kovalent an die immobilisierten Nukleotide gebunden oder kovalent an die feste Phase gebunden werden.

Zur Detektion werden dabei Fluorochrome eingesetzt, die an die DNA binden oder Fluorochrome, die an

die DNA binden und mit den immobilisierten Nukleotiden kovalent verknüpft sind.

Desweiteren können zur Detektion elektroaktive Interkallatoren oder andere DNA-Binder eingesetzt werden, elektroaktive Interkallatoren oder andere DNA-Binder, die an die DNA binden und mit den immobilisierten Nukleotiden kovalent verknüpft sind oder die Detektion wird durch elektroaktive DNA-Binder vermittelt, die entweder zugegeben oder kovalent an die immobilisierten Nukleotide gebunden oder kovalent an die feste Phase gebunden werden.

Mit der Erfindung werden ein Mittel und ein Verwendungsverfahren zur Verfügung gestellt, mit denen eine sehr präzise Diagnose der jeweiligen Tumorerkrankung möglich ist. Ein wesentlicher Vorteil besteht darin, daß jede Art von Tumorzellen erkannt und nachgewiesen werden kann. Dadurch kann eine optimale Therapie des jeweiligen Falles durchgeführt werden.

#### Patentansprüche

1. Mittel zur komplexen molekularen Tumordiagnostik, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens 2 verschiedene Oligonukleotide oder Polynukleotide mit definierter Komplementarität zu Tumormarkergenen enthält.
2. Mittel zur komplexen molekularen Tumordiagnostik, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens 2 verschiedene Oligonukleotide oder Polynukleotide mit definierter Komplementarität zu mehreren Tumormarkergenen enthält.
3. Mittel zur komplexen molekularen Tumordiagnostik, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens 2 verschiedene Oligonukleotide oder Polynukleotide mit definierter Komplementarität zu einem Tumormarkergen enthält.
4. Mittel nach Anspruch 1—3, dadurch gekennzeichnet, daß es 2 Oligonukleotide oder Polynukleotide enthält.
5. Mittel nach Anspruch 1—3, dadurch gekennzeichnet, daß es 3 Oligonukleotide oder Polynukleotide enthält.
6. Mittel nach Anspruch 1—3, dadurch gekennzeichnet, daß es 4 bis 12 Oligonukleotide oder Polynukleotide enthält.
7. Mittel nach Anspruch 1—6, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide oder Polynukleotide komplementär zu Tumorsuppressoren sind.
8. Mittel nach Anspruch 1—6, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide oder Polynukleotide komplementär zu Onkogenen sind.
9. Mittel nach Anspruch 1—6, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide oder Polynukleotide komplementär zu den Tumormarkergenen p53, Rb, p16, cyclinD1, cdk4, Ki-ras, APC, DCC, p53, bcl-2, bax, PSA, HPV, mdrl oder membran-gebundene humane Metallomatrixproteasen wie z. B. MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP oder MT4-MMP, sind.
10. Mittel nach Anspruch 1—9, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens 2 verschiedenen Oligonukleotide oder Polynukleotide mit definierter Komplementarität zu einem, bevorzugt mehreren, Tumormarkergenen an eine feste Phase gebunden sind.
11. Mittel nach Anspruch 1—10, dadurch gekennzeichnet, daß die feste Phase die Oberfläche eines Lichtwellenleiters oder eines Evaneszentfeld-

Transducers (einschließlich Oberflächenplasmonenresonanz, SPR) darstellt.

12. Mittel nach Anspruch 1—10, dadurch gekennzeichnet, daß die feste Phase die Oberfläche eines Schwingquarzes eines elektroakustischen Oberflächenschwingers (SAW) darstellt.

13. Mittel nach Anspruch 1—10, dadurch gekennzeichnet, daß die feste Phase die Oberfläche einer Elektrode oder einer Interdigitalelektrode darstellt.

14. Mittel nach Anspruch 1—10, dadurch gekennzeichnet, daß die feste Phase aus einem Glas, Quarzglas, Silizium oder Siliziumoxid oder Gemischen davon, Tantaloxid, Gold, Platin oder einem anderen Edelmetall sowie Legierungen davon besteht.

15. Mittel nach Anspruch 1—10, dadurch gekennzeichnet, daß die feste Phase aus einem Kunststoff wie Polystyrol oder Polycarbonat besteht.

16. Mittel nach Anspruch 1—10, dadurch gekennzeichnet, daß die feste Phase die Form eines Mikrochips hat.

17. Mittel nach Anspruch 1—16, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide auf der festen Phase systematisch, z. B. in Streifen oder Rechtecken, angeordnet sind, um eine eindeutige Zuordnung zu gewährleisten.

18. Mittel nach Anspruch 1—17, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide oder Polynukleotide auf der festen Phase kovalent gebunden sind, z. B. durch Knüpfen einer 5'-Phosphordiesterbindung, oder durch direkte Synthese auf dem Chip.

19. Mittel nach Anspruch 1—18, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide oder Polynukleotide auf der festen Phase über irreversible Brückenfunktionen wie Biotin-Avidin gekoppelt, und dabei Avidin bzw. Streptavidin kovalent über Vernetzung an die Oberfläche gekoppelt sind.

20. Mittel nach Anspruch 1—19, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide oder Polynukleotide auf der festen Phase über Brückenfunktionen reversibel gebunden sind, z. B. durch Disulfidbindungen.

21. Verwendung des Mittels nach Anspruch 1—10 zur komplexen Tumordiagnostik, dadurch gekennzeichnet, daß das Mittel mit Nukleinsäuren (DNS, RNS oder virale Nukleinsäuren) aus Tumormaterial inkubiert wird, wobei entweder das Mittel oder die Nukleinsäure an eine feste Phase gebunden und der jeweils andere Partner markiert ist, und das an die Festphase gebundene Hybridisierungsprodukt über die Markierung detektiert und quantifiziert wird.

22. Verwendung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Mittel an der Festphase gebunden ist und mit markierten Nukleinsäuren aus Tumormaterial inkubiert wird.

23. Verwendung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus Tumormaterial an der Festphase gebunden werden und mit dem markierten Mittel inkubiert wird.

24. Verwendung nach Anspruch 21—23, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus Tumormaterial durch Lyse dieser Zellen mit Lösungen, die chaotrope Salze enthalten, oder mittels Proteinase K, Bindung der Nukleinsäuren an mineralische Trägermaterialien, vorzugsweise nichtporöse SiO<sub>2</sub>-Partikel mit einer Größe von kleiner 50 nm und Elution der gebundenen Nukleinsäuren mit

- Puffern, die geringe Ionenstärken enthalten, isoliert werden.
25. Verwendung nach Anspruch 1 und 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren (DNS, RNS oder virale Nukleinsäuren) aus nichtinvasiven verfügbaren Ausgangsmaterialien gewonnen werden. 5
26. Verwendung nach Anspruch 21–25, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis von Veränderungen der Tumormarkergene über basenkomplementäre Hybridisierungsreaktionen an fester Phase erfolgt, wobei sich entweder ein Sequenzabschnitt des Tumormarkergens, das Oligonukleotid oder das Polynukleotid an fester Phase befinden und mit dem jeweiligen basenkomplementären Oligonukleotid oder Polynukleotid bzw. dem Sequenzabschnitt des Tumormarkergens inkubiert wird. 10 15
27. Verwendung nach Anspruch 21–26, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Hybridisierungsreaktion direkt über laserinduzierte Anregung einer oder mehrerer Fluoreszenzsonden erfolgt. 20
28. Verwendung nach Anspruch 21–26, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion im evaneszenten Feld eines Lichtwellenleiters oder eines strukturierten Lichtwellenleiters oder durch Oberflächenplasmonenresonanz erfolgt. 25
29. Verwendung nach Anspruch 21–26, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion mittels eines elektroakustischen Transducers (Schwingquarz oder SAW) erfolgt. 30
30. Verwendung nach Anspruch 21–26, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion mittels einer Elektrode oder Interdigitalelektrode, vorzugsweise unterstützt durch elektroaktive DNA-Binder, erfolgt. 35
31. Verwendung nach Anspruch 21–26, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion durch Fluorochrome vermittelt wird, die entweder zugegeben oder kovalent an die immobilisierten Oligonukleotide gebunden oder kovalent an die feste Phase gebunden werden. 40
32. Mittel nach Anspruch 21–26 und 31, dadurch gekennzeichnet, daß zur Detektion Fluorochrome eingesetzt werden, die an die DNA binden. 45
33. Mittel nach Anspruch 21–26 und 31, dadurch gekennzeichnet, daß zur Detektion Fluorochrome eingesetzt werden, die an die DNA binden und mit den immobilisierten Oligonukleotiden kovalent verknüpft sind. 50
34. Mittel nach Anspruch 21–26, dadurch gekennzeichnet, daß zur Detektion elektroaktive Interkalatoren oder andere DNA-Binder eingesetzt werden. 55
35. Mittel nach Anspruch 21–26, dadurch gekennzeichnet, daß zur Detektion elektroaktive Interkalatoren oder andere DNA-Binder eingesetzt werden, die an die DNA binden und mit den immobilisierten Oligonukleotiden kovalent verknüpft sind. 60
36. Verwendung nach Anspruch 21–26, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion durch elektroaktive DNA-Binder vermittelt wird, die entweder zugegeben oder kovalent an die immobilisierten Oligonukleotide gebunden oder kovalent an die feste Phase gebunden werden. 65